

# ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ПРОГРЕССИРУЮЩИМ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫРАЖЕННОСТИ ДЕСТРУКТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ

Кноринг Б.Е.<sup>1</sup>, Давыдова Н.И.<sup>2</sup>, Басек Т.Ф.<sup>1</sup>, Ница Н.А.<sup>1</sup>,  
Елькин А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> ФГУЗ ВЦЭРМ им. А.М. Никитина МЧС России, НИЛ клеточного и гуморального иммунитета,  
Санкт-Петербург

**Резюме.** Исследовано состояние иммунитета у больных прогрессирующим ФКТ с различной выраженностью деструктивных изменений в легких. Установлено, что признаком увеличения деструкции является нарастание числа специфических цитотоксических лимфоцитов, NK-, NKT-, CD95-клеток и активированных Т-лимфоцитов при значительном снижении количества Т-хелперов, В-лимфоцитов, CD25-клеток, наряду с угнетением антигенспецифического клеточного ответа и функциональной несостоятельностью Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов. Увеличение тяжести процесса согласуется с активацией В-звена и ослаблением фагоцитарной функции нейтрофилов.

Выявлены существенные отличия в спонтанной и индуцированной продукции IFN $\gamma$ , IL-2 и IL-8 у различных групп больных ФКТ. Выявленные нарушения в иммунном и цитокиновом статусе у определенной части больных прогрессирующим ФКТ указывают на истощение возможностей иммунной системы. На основании полученных данных установлены критерии, определяющие тяжесть иммунопатологических проявлений у больных прогрессирующим ФКТ и прогностически значимые при определении тенденций развития специфического процесса и целесообразности проведения иммунокоррекции.

**Ключевые слова:** туберкулез, деструкция, лимфоциты, цитокины.

*Knoring B.E., Davydova N.A., Basek T.S., Nica N.A., Elkin A.V.*

## IMMUNE INDEXES IN PATIENTS WITH PROGRESSIVE FIBROUS-CAVERNOUS TUBERCULOSIS DEPENDENT ON SEVERITY OF DESTRUCTIVE CHANGES IN THE LUNGS

**Abstract.** We have studied cellular immune state in patients with progressive fibrous cavernous tuberculosis (FCT) with varying severity of lung destructive changes. It was found that increasing number of specific cytotoxic lymphocytes, NK-, NKT-, CD95-cells and activated T-lymphocytes, accompanied by a significant decrease of T-helper cells, B cells, CD25-cells, is a sign of destruction, along with inhibition of antigen-specific cellular response and functional insufficiency of T-helper and cytotoxic lymphocytes. Increased severity of the disease is consistent with activation of B cell compartment and weaker phagocytic function of neutrophils. Significant differences were revealed in spontaneous

### Адрес для переписки:

Кноринг Беатриса Ефимовна  
192281, Санкт-Петербург, ул. Купчинская, 8,  
корп. 1, кв. 186.  
Тел.: (812) 579-24-21.  
E-mail: sdknor@mail.ru

and induced production of  $IFN\gamma$ , IL-2 and IL-8 between various groups of patients with FCT. The alterations of immune and cytokine status in a certain clinical subgroup with progressing FCT were indicative for depletion of immune system potential. As based on these data, we have established some criteria in order to assess severity of immune pathology in the patients with progressing FCT which may be of predictive value for evaluating trends in development of the specific process and feasibility of immune correction therapy. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 4-5, pp 329-336)

**Keywords:** tuberculosis, destruction, lymphocytes, cytokines.

## Введение

Неуклонный рост больных прогрессирующим на фоне химиотерапии лекарственно устойчивым фиброзно-кавернозным туберкулезом (ФКТ) с неблагоприятным прогнозом заболевания требует определения причин безуспешного лечения [14, 17]. Известно, что иммунопатологические факторы отягощают течение туберкулеза [6, 10, 16]. Вместе с тем, степень выявленных нарушений и их направленность при ФКТ неоднозначны. Применение иммунокорректирующих препаратов, используемых у больных ФКТ, не всегда эффективно, что, возможно, связано с недостаточно глубокой оценкой состояния иммунитета больного и резервных возможностей организма.

**Цель работы** заключается в определении закономерностей изменений иммунной системы у больных прогрессирующим ФКТ при различной выраженности деструктивных изменений в легких.

## Материалы и методы

Клинико-иммунологическое обследование выполнено 95 больным фиброзно-кавернозным туберкулезом, неуклонно прогрессирующим на фоне проводимой терапии. У всех больных при поступлении установлены выраженная интоксикация, массивное бактериовыделение. Штаммы выделенных микобактерий имели множественную лекарственную устойчивость. Выраженный распад легочной ткани ( $\geq 4$  сегментов) выявлен у 58 больных, менее распространенные (ограниченные) деструктивные изменения ( $< 4$  сегментов) имели место у 37 пациентов. Больные с большей протяженностью деструктивных изменений составили 1 группу, с более ограниченными изменениями — 2 группу. Всем больным проведено следующее клинико-лабораторное обследование. Оценивали показатели лейкограммы крови. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов крови основывалось на оценке их поверхностного фенотипа с использованием набора моноклональных антител фирмы Becton Dickinson (USA) к маркерам клеточной дифференцировки ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD16^+$ ,  $CD19^+$ ,  $CD25^+$ ,  $HLA-DR^+$ ,  $CD95^+$ ) и проточного цитофлюориметра. Пролиферативную активность

лимфоцитов крови в ответ на туберкулин и РНА изучали методом ДНК-цитометрии на проточном цитофлюориметре FACS Calibur (BD, США) в программе CellQuest (5). Специфический гуморальный ответ оценивали по комплексу серологических реакций с использованием в качестве антигена туберкулина Линниковой. Концентрацию иммуноглобулинов классов G, A, M определяли методом радиальной иммунодиффузии по Mancini. Молекулярный состав ЦИК определяли методом дифференцированной преципитации в 3%, 5% и 7% растворах ПЭГ (12). Функциональную активность нейтрофилов оценивали с помощью спонтанного и индуцированного зимозаном НСТ-теста (4), способность к фагоцитозу определяли методом световой микроскопии, используя в качестве объекта фагоцитоза убитые нагреванием клетки дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Концентрацию цитокинов интерлейкина (IL) 8 и интерферона-гамма ( $IFN\gamma$ ) в сыворотке крови и супернатантах мононуклеаров периферической крови (МПК), индуцированных фитогемагглютинином (РНА) и туберкулином (PPD) и не стимулированных, определяли методом иммуноферментного анализа, используя тест-системы производства «Цитокин», Санкт-Петербург. Продукцию IL-2 МПК исследовали биологическим методом (2) путем оценки пролиферации IL-2-зависимой Т-клеточной линии CTLL-2 (Т-лимфоциты мыши).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Для выявления статистической достоверности между группами был использован критерий Стьюдента. Для выявления зависимостей между переменными использовались коэффициенты ранговой корреляции Спирмена. Различия в сравниваемых группах считались достоверными при уровне двусторонней статистической значимости ( $p$ ) менее 0,05.

## Результаты

В результате проведенного исследования наблюдали гетерогенные нарушения в характере иммунного ответа у больных прогрессирующим ФКТ, различающиеся по выраженности деструктивных изменений в легких. Анализ данных лейкограммы (табл. 1) показал, что увеличение протяженности деструкции сопровождается достоверным увеличением доли больных с высоким

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ПРОГРЕССИРУЮЩИМ ФКТ ЛЕГКИХ С РАЗЛИЧНОЙ ВЫРАЖЕННОСТЬЮ ДЕСТРУКТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ (M±m)

Показатели	Контрольная группа Здоровые лица	1-я группа Выраженные деструктивные изменения	2-я группа Ограниченные деструктивные изменения
CD3 <sup>+</sup> , %	70,4±5,4	69,75±10,12	70,05±6,47
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	47,3±6,4	41,3±9,9**	43,85±7,37
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	23,1±5,1	28,04±7,9	26,47±5,7
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	2,2±0,64	1,56±0,52	1,73±0,63
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	7,2±2,27	6,76±2,58	5,36±2,58**
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> , %	15,3±5,1	16,75±8,34	14,4±6,5
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> , %	4,5±2,46	7,1±6,07	8±5,7
CD19 <sup>+</sup> , %	13,3±5,8	10,34±5,98*	13,9±6,96*
CD3 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup> , %	8,9±3,37	14,2±10,7*,**	9,2±5,1*
CD3 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup> , %	16,46±4,3	13,0±5,6*	17,4±7,5 *
CD25 <sup>+</sup> , %	13,77±5,9	12,9±6,5*	18,5±5,1***
CD95 <sup>+</sup> , %	44,57±12,5	59,5±14,1**	54,2±12,8
РБТЛ на РPD, %	6,02±4,1	4,98±4,08*,**	6,94±4,64*
РБТЛ на РНА, %	24,6±5,3	19,7±7,67	21,46±5,4
РПК, у.е.	15,2±4,6	42,38±12,4**	39,4±20,0**
РГЛ, у.е.	6,3±3,8	27,0±8,79**	25,5±14,4**
IgA, г/л	1,84±0,64	4,1±2,64*,**	3,35±1,59*,**
IgG, г/л	12,2±3,97	17±9,25*,**	14,2±5,62*
IgM, г/л	1,86±0,65	2,21±1,06	1,92±0,1
ЦИК, у.е. крупномол.	16,3±6,14	20,2±16,9	11,25±7,7**
ЦИК, у.е. среднемол.	35,1±10,1	62,9±42,5**	48,25±11,5**
ЦИК, у.е. низкомол.	97,9±31,5	198,1±116,3**	133,8±51,3**
IFN $\gamma$ , стимул. РPD, пг/мл	459,5±92,1	34,54±13,2*,**	120,9±50,3*,**
IFN $\gamma$ , стимул. РНА, пг/мл	2465,1±337,5	113,48±34,5*,**	504,9±172,7*,**
IL-2P, у.е. стимул. РPD у.е.	0,2±0,12	2,74±4,3*	1,1±1,56*
IL-2F, у.е. стимул. РНА у.е.	10,6±3,8	2,97±4,44*,**	5,8±7,67*,**
(IL-2F)-(IL-2P), у.е.	10,2±3,6	0,31±4,89*,**	4,65±6,86*,**
IL-8, стимул., РPD, пг/мл	8541,3±6682,3	18496±3466*,**	10786±7563*
IL-8, стимул., РНА, пг/мл	11626,5± 5687	21400±8141*,**	10599± 6575*
Лейкоциты, × 10 <sup>9</sup> кл/мл	5,83±1,3	13,58±6,09*,**	10,4±3,34*,**
Лимфоциты, %	31,8±8,9	17,2±5,87*	22,1±6,4*
Сегментояд, %	54,4±6,9	67,26±6,4*,**	64,0±5,3*,**
Моноциты, %	6,3±1,96	7,05±2,8*	5,6±2,6*
СОЭ, мм/ч	12,6±2	42±14,3**	32±18,6**
Пал/яд	2,47±1,5	7,0±4,2*,**	5,1±3,2*,**

**Примечание.** \*\* – достоверные отличия от доноров ( $p < 0,05$ ); \* – достоверные различия средних показателей между обследуемыми группами ( $p < 0,05$ ).

СОЭ  $\geq 30$  мм/ч (у 84,6% vs 50% в альтернативной группе), лейкоцитозом  $> 10000$  кл/мл (у 73,68% vs 44,59%), лимфопенией  $< 20\%$  (у 73,7% vs 35,1%),  $p < 0,05$ , а также увеличением нейтрофилии, моноцитоза, палочко-ядерного сдвига.

Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных ФКТ, в зависимости

от выраженности деструктивных изменений, показала, что по средним значениям относительного содержания исследованных субпопуляций лимфоцитов в большинстве случаев достоверных различий между группами не выявлено. При частотном анализе установлено, что по мере нарастания деструктивных изменений в легких сни-

жается соотношение  $CD4^+/CD8^+$  за счет более высокого ( $> 36\%$ ) содержания специфических цитотоксических лимфоцитов (у 23% больных 1 группы vs 3,5% во 2 группе) и низкого ( $< 32\%$ ) содержания Т-хелперов (у 26,1% больных 1 группы и 5,26% во 2). Снижение соотношения  $CD4/CD8$  ( $< 1,5$ ) было характерно для половины больных прогрессирующим ФКТ, но у каждого 4-го больного это снижение было очень значительным ( $< 1,2$ ). Доля больных с индексом  $< 1,2$  составляет 33,6% при обширной деструкции в легких и 10,5% среди пациентов с ограниченной деструкцией,  $p < 0,05$ .

Одновременно с увеличением полостей распада уменьшается количество В-лимфоцитов,  $CD3^+HLA-DR^+$  клеток, а также количество лимфоцитов крови, экспрессирующих  $CD25$ -рецептор к IL-2 (табл. 1). Наряду с этим, значительное нарастание количества натуральных киллеров (NK), NKT-клеток, лимфоцитов, экспрессирующих маркер готовности к апоптозу –  $CD95$ , а также активированных Т-лимфоцитов, оказалось характерным признаком увеличения деструкции. Отчетливое превышение нормативных показателей указанных параметров зарегистрировано, соответственно, у 43,75%, 28%, 36%, 28,2% больных 1 группы против 16,7%, 5,9%, 8,3%, 0% ( $p < 0,05$ ) при ограниченной деструкции в легких. При нарастании деструкции достоверно снижалась и пролиферативная активность лимфоцитов, причем наиболее резко у больных 1 группы (табл. 1). Преимущественное угнетение антиген-специфического Т-клеточного ответа у больных прогрессирующим ФКТ с множественными полостями распада подтверждается отчетливой обратной корреляционной зависимостью ( $r = -0,54$ ;  $p < 0,05$ ), отсутствующей у пациентов 2 группы. Сравнительный анализ параметров гуморального иммунитета выявил повышение синтеза общих IgG и особенно IgA у больных обеих групп. Однако среди пациентов с распространенной деструкцией средний уровень иммуноглобулинов классов G и A, а также частота встречаемости высоких значений ( $> 20$  г/л и  $> 5$  г/л) выше таковых при ограниченной деструкции (табл. 1). В выработке IgM достоверных отличий между группами больных и доноров не выявлено.

У подавляющего большинства больных зарегистрировано значительное увеличение уровня продукции противотуберкулезных комплементсвязывающих и гемолизирующих антител ( $\geq 30$  у.е. и  $\geq 25$  у.е.), указывающих на наличие выраженного распада ткани легкого. Высокий уровень комплементсвязывающих и гемолизирующих антител в 100% случаях характерен для выраженных деструктивных процессов. При менее значительной деструкции высокие значения РПК и РГЛ встречаются в 1,5–2 раза реже

( $p < 0,001$ ). Наряду с этим наличие гемолизирующих ПТАТ, превышающее 25 у.е., является показателем диссеминации процесса. При двухстороннем поражении легких высокие показатели в РГЛ отмечались у 77,8% больных, при одностороннем – у 43,75% ( $p < 0,04$ ). Специфические антитела, выявляемые иммуноферментным методом, независимо от распространенности деструкции, одинаково часто определяются у всех пациентов с прогрессирующим ФКТ.

Представление о патогенетических механизмах прогрессирования туберкулезного процесса может быть дополнено при изучении роли ЦИК в развитии заболевания.

У всех больных ФКТ легких независимо от распространенности процесса уровень наиболее патогенных ЦИК мелкого и среднего размера, образующихся при избытке антигена, при сравнении с донорами оказался повышенным. Однако именно при обширной деструкции легочной ткани установлено их значительное преобладание. Повышенные уровни низко- и среднемолекулярных ЦИК ( $> 180$  у.е. и  $> 70$  у.е.) встречались у 42,9% и 42,1% пациентов с ФКТ с выраженным распадом ткани в легких и лишь у 12,5% и 0% больных с ограниченным деструктивным процессом,  $p = 0,01$ . Известно, что эти ЦИК с трудом элиминируются из организма, обладают высокой комплемент-активирующей способностью и тем самым способствуют поддержанию воспалительного процесса в бронхолегочной системе.

Увеличение протяженности полостей распада в легких согласуется с тенденцией к нарастанию функциональной активности нейтрофилов (при оценке метаболической активности по показателям как спонтанного, так и индуцированного НСТ-теста) – от  $126,8 \pm 60,5$  у.е. и  $260,4 \pm 81,6$  до  $180 \pm 43,4$  у.е,  $p < 0,05$  и  $350,6 \pm 110,3$  у.е., что в дальнейшем может привести к истощению функциональных резервов. При значительной распространенности деструктивных изменений (более 8 сегментов) у ряда больных отмечается депрессия кислородзависимого метаболизма (все показатели НСТ снижаются). Поглотительная способность в обеих группах была достоверно выше физиологической нормы ( $2,98 \pm 0,5$ ), но при увеличении распада повышалась значительно ( $3,26 \pm 0,83$  и  $3,6 \pm 0,66$   $p < 0,1$ ), а фагоцитоз чаще носил незавершенный характер ( $0,98 \pm 0,12$  vs  $1,169 \pm 1,03$  при ограниченной деструкции).

Значительную роль в защите организма от туберкулезной инфекции играют цитокины. При изучении продукции цитокинов получены следующие основные результаты (табл. 1). Изменения средних показателей синтеза индуцированного  $IFN\gamma$  свидетельствовали о его достоверно более низкой продукции у больных ФКТ, чем у практически здоровых людей. Наиболее значимое

снижение синтеза  $IFN\gamma$  отмечалось у пациентов с полостями распада в обоих легких ( $< 10$  пг/мл в ответ на индукцию PPD у 40% больных и менее 100 пг/мл в ответ на РНА у 70% против 13,04% и 21,78% в альтернативной группе, 0% у доноров,  $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Выработка IL-2 МПК в ответ на РНА (IL-2F) у пациентов с обширной деструкцией была достоверно ниже таковой у больных с более ограниченными изменениями в легких. Отсутствие синтеза IL-2F выявлено у каждого 3-го больного 1 группы. Низкий и слабо выраженный синтез IL-2F (от 0,2 до 9,0 у.е.) одинаково характерен для больных с распространенными и более ограниченными деструктивными изменениями (57,14% и 53,1% соответственно). Высокая продукция индуцированного РНА IL-2 ( $> 0,9$  у.е.) чаще выявлялась у больных с ограниченными изменениями в легких (табл. 1).

При стимуляции клеток PPD (IL-2P) отмечалась обратная ситуация. Частотный анализ выявил, что чрезмерно высокая выработка IL-2P ( $> = 4$  у.е.) достоверно чаще (22,5% vs 6,25%,  $p < 0,05$ ) отмечалась среди больных с обширной деструкцией, а его отсутствие или слабая выработка ( $< 1$  у.е.) более характерны для лиц с меньшей протяженностью деструктивных изменений (табл. 1). При этом важно знать соотношение интенсивности в выработке IL-2 в ответ на общий и специфический митоген. Как видно из таблицы, отрицательная величина или отсутствие разницы между показателями IL-2F и IL-2P в большинстве случаев (62,50%) встречаются при тяжелых распространенных процессах. Особенно четко это отмечается при учете только отрицательных результатов, при которых доля больных с выраженной деструкцией составила среди пациентов с ограниченной деструкцией ( $p < 0,05$ ). Выраженное преобладание продукции IL-2F над продукцией IL-2P ( $> 10$  у.е.) чаще встречается при ограниченном поражении легочной ткани (18,75% против 4,1% у больных с выраженной деструкцией).

Средние показатели продукции IL-8, индуцированного РНА и PPD, у лиц с обширными полостями распада в легких достоверно превышали таковые как у доноров, так и в альтернативной группе (табл. 1). Низкий уровень индуцированного IL-8 ( $< 10000$  пг/мл и особенно  $< 5000$  пг/мл) характерен только для ограниченных поражений легкого (табл. 1). Аналогичная направленность отмечена и в спонтанной выработке IL-8. Резко повышенный синтез спонтанной продукции IL-8 ( $> 30000$ ) отмечен у 13,64% больных только при двустороннем поражении легких.

Таким образом, разность между IL-2F и IL-2P, равная или меньше нуля, отсутствие как индуцированной, так и спонтанной продукции  $IFN\gamma$ ,

**ТАБЛИЦА 2. ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ОТКЛОНЕНИЯ В ИММУННОМ СТАТУСЕ БОЛЬНЫХ ФКТ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТЯЖЕСТИ ПРОЦЕССА**

Информативные параметры	Прогрессирование деструктивного процесса
	Уровень прогностически значимых изменений
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	$< 33\%$
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	$> 36\%$
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	$< 1,2$
CD19 <sup>+</sup>	$< 7\%$
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	$> 21\%$
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	$> 20\%$
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	$< 7\%$
РБТЛ-PPD	$\leq 5\%$
РБТЛ-РНА	$< 17\%$
РПК	$> 30$ у.е.
РГЛ	$> 25$ у.е.
(IL-2F)-(IL-2P)	$\leq 0$ у.е.
$IFN\gamma$ РНА	$< 100$ пг/мл
IL-8 спонт	$> 30000$ пг/мл

наряду с высоким уровнем выработки спонтанного и индуцированного IL-8, свидетельствует о прогрессирующем распаде легочной ткани, тяжести заболевания. На основании полученных данных были установлены критерии, определяющие тяжесть иммунопатологических проявлений у больных прогрессирующим ФКТ (табл. 2). Наличие у больного трех и/или более отмеченных параметров свидетельствует о необходимости повторного исследования в динамике наблюдения и при сохранении имеющихся нарушений о целесообразности применения иммуномодулирующих препаратов.

## Обсуждение

Полученные в работе данные свидетельствуют о существенных различиях в состоянии иммунной системы у больных с ограниченным и более выраженным распадом ткани легкого. Нарастание различных иммунопатологических отклонений ассоциируется с увеличением деструктивных очагов в легких.

Выраженное снижение относительного содержания Т-хелперов у больных с длительно текущим процессом с обширными полостями распада в легких, сочетающееся со сниженным соотношением CD4/CD8, может свидетельствовать о развитии дефицита в Т-клеточном звене. Последнее косвенно подтверждается прямой корреляционной связью количества CD4<sup>+</sup> лимфоцитов и CD95<sup>+</sup> ( $r = 0,94$ ;  $p < 0,0001$ ), сниженной продукцией  $IFN\gamma$ , а также взаимосвязью CD4<sup>+</sup> лимфоцитов с В-клетками ( $r = 0,51$ ;

$p < 0,0001$ ). Выявленные изменения косвенно указывают на возможное превалирование ответа по Th2-типу.

Повышенное количество  $CD8^+$ T-лимфоцитов, по-видимому, вызвано их экспансией в ответ на продукты микобактерий в условиях персистирующей инфекции [3]. При этом избыточная пролиферация цитотоксических лимфоцитов может способствовать дальнейшему разрушению собственных тканей. Ряд исследователей относит определяемые у пациентов с ФКТ  $CD8^+$  лимфоциты к цитотоксическим клеткам 2 типа (Tc2), что способствует прогрессированию туберкулезного процесса [18].

Проведенный корреляционный анализ выявил у больных с обширной деструкцией прямую взаимосвязь  $CD8^+CD3^+$  лимфоцитов с В-лимфоцитами ( $r = 0,46$ ;  $p < 0,001$ ), обратную – с продукцией  $IFN\gamma$ , индуцированной PPD ( $r = -0,66$ ;  $p < 0,03$ ). Снижение синтетической функции циркулирующих  $CD8^+CD3^+$  клеток, направленной на поддержку специфического клеточного ответа, возможно, свидетельствует о наличии функциональной несостоятельности цитотоксических лимфоцитов в условиях распада легочной ткани. В то же время значительное повышение количества  $CD3^+HLA-DR^+$  клеток при нарастании деструкции, наряду с их отчетливой корреляционной связью с  $CD8^+$  лимфоцитами ( $r = 0,6$ ;  $p < 0,001$ ), свидетельствует о тенденции к чрезмерному увеличению активности цитотоксических Т-лимфоцитов, возможно, относящихся к Tc2. С другой стороны, экспрессия  $HLA-DR^+$  молекул у больных ФКТ легких может быть представлена не только на цитотоксических Т-лимфоцитах, несущих рецепторы к антигенам микобактерий, но и на  $CD8^+$  клетках, несущих рецепторы к антигенам легочной ткани, что также может вносить свой вклад в повреждение тканей. При обширных деструктивных изменениях в легких клон лимфоцитов, специфических к туберкулину, по-видимому, меньше и характеризуется более низкой цитотоксической активностью, чем при ограниченных формах ФКТ, что подтверждается достоверно более низким пролиферативным ответом лимфоцитов на PPD и более низкой выработкой  $IFN\gamma$  у пациентов 1 группы. Описанные наблюдения позволяют предположить участие цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+$ ) как в защитных реакциях, так и в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции. Обратная корреляционная связь  $CD8^+CD3^+$  лимфоцитов с В-клетками ( $r = -0,65$ ;  $p < 0,001$ ), выявленная у больных 2 группы, косвенно указывает на более выраженную у них поддержку клеточных факторов иммунитета. Корреляционной связи между Т-хелперами и  $CD3^+HLA-DR^+$  клетками у больных с ограниченной деструкцией нет. При уве-

личении распада легочной ткани регистрируется обратная зависимость ( $r = -0,56$ ;  $p < 0,01$ ), что косвенно позволяет предположить недостаточную функциональную активность  $CD4^+$  лимфоцитов.

Повышение уровня клеток, несущих  $CD95^+$  маркер, у пациентов 1 группы указывает как на активацию иммунной системы при ответе на антиген, так и на высокую степень готовности клеток к апоптозу [7]. Прямая корреляционная связь между выраженностью деструктивных изменений в легких и экспрессией  $CD95$ -молекул ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) у больных с обширными полостями распада подтверждает наличие у них ускоренного апоптоза клеток, развития Т-дефицита. Экспрессия рецепторов к IL-2 ( $CD25^+$ ) у пациентов с обширной деструкцией была сопоставима с таковой в контрольной группе. У больных 2 группы, напротив, отмечалось двукратное увеличение доли пациентов с высоким уровнем  $CD25^+$  лимфоцитов (25% случаев) по сравнению с пациентами 1 группы (12%) и 8-кратное по сравнению с донорами (2,9%). При этом количество  $CD25^+$  клеток находилось в обратной зависимости от выраженности деструкции ( $r = -0,48$ ;  $p < 0,01$ ). Возможно, отсутствие увеличения экспрессии  $CD25$ -молекул у больных со значительной протяженностью полостей распада обусловлено функциональным истощением иммунокомпетентных клеток в связи с длительной массивной антигенемией. Подтверждением этому служит наиболее резкое снижение продукции IL-2, стимулированной РНА при обширной деструкции (табл. 1). Продукция IL-2, стимулированная туберкулином, напротив, значимо превышала таковую в контрольной группе. При этом обращает на себя внимание одинаковый уровень выработки у них IL-2 как при индукции PPD, так и РНА, в отличие от больных 2 группы (табл. 1). По-видимому, основными продуцентами IL-2 при наличии обширной деструкции и высокой антигенемии являются специфические клоны лимфоцитов.

Дополнительно проведенное исследование показало, что у больных с выраженным распадом легочной ткани повышенная выработка индуцированного и спонтанного IL-4 определялась в 2 раза чаще, чем у пациентов с ограниченными изменениями в легких. При этом выявлена корреляционная связь  $CD25^+$  лимфоцитов с индуцированной РНА продукцией IL-4 ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,01$ ) и с пролиферативным ответом лимфоцитов на PPD ( $r = 0,76$ ;  $p = 0,01$ ).

Выявленные ассоциации позволяют предположить, что в результате выраженной антигенной стимуляции у больных 1 группы происходит негативный тип активации лимфоцитов, с последующим апоптозом и элиминацией функциональ-

но неполноценных иммунокомпетентных клеток [7, 14].

У лиц с ограниченными деструктивными изменениями отсутствовала корреляция CD25-клеток с пролиферативным ответом лимфоцитов на PPD, но прослеживалась прямая взаимосвязь со спонтанной продукцией IL-10, IFN $\gamma$ , NK-клетками и обратная с индуцированной РНА выработкой IL-4 (соответственно,  $r = 0,81; 0,62; 0,65; -0,54; p < 0,05$ ). По-видимому, у пациентов 2 группы более выражена клеточная составляющая иммунного ответа, а увеличение экспрессии CD25 на лимфоцитах обусловлено появлением не только активированных Т-клеток, но и Т-клеток с супрессорной активностью [13, 17].

Наиболее резко выраженное снижение пролиферативной активности лимфоцитов у больных с выраженным распадом ткани легких, по-видимому, объясняется меньшей активностью IL-2, продуцируемого специфическими клонами лимфоцитов, по сравнению с таковой у больных 2 группы. Кроме того, снижение пролиферативного ответа Т-лимфоцитов может быть обусловлено повышенным апоптозом CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  Т-клеток, [7]. На это же указывает выявленная в работе прямая корреляционная связь зрелых Т-лимфоцитов с экспрессией маркера готовности к апоптозу — CD95 $^{+}$  ( $r = 0,5; p < 0,01$ ). Помимо апоптоза снижение антигенспецифического ответа у больных остро прогрессирующим туберкулезом может быть обусловлено анергией Т-клеток [8].

Уменьшение количества В-лимфоцитов у пациентов с обширной деструкцией может быть связано как с усиленным антителообразованием, так и с нарушением функции Т-лимфоцитов. Высокий уровень иммуноглобулинов классов А и G, а также частота встречаемости высоких значений указывают на то, что в основном снижение содержания В-лимфоцитов обусловлено их дифференцировкой в плазматические клетки. Наряду с этим, обращает на себя внимание положительная корреляционная связь количества В-клеток со спонтанной и индуцированной туберкулином пролиферацией лимфоцитов среди больных с ограниченной деструкцией (соответственно,  $r = 0,9; p < 0,01$  и  $r = 0,82; p < 0,03$ ). При наличии обширных полостей распада в легких эта связь исчезает. Возможно, при ФКТ в ответ на специфический антиген в первую очередь пролиферируют именно специфические клоны В-лимфоцитов. На большую вероятность сохранения пролиферативного потенциала В-клеток у пациентов с менее выраженной деструкцией указывает и обратная связь В-лимфоцитов, в отличие от Т-клеток, с экспрессией маркера готовности к апоптозу — CD95 ( $r = -0,46; p < 0,05$ ). У больных 1 группы, по-видимому, доминиру-

ют процессы дифференцировки, приводящие к уменьшению, как самого пула В-лимфоцитов, так и специфических клонов В-лимфоцитов.

До настоящего времени вопрос о значении факторов гуморального иммунитета при туберкулезе остается дискуссионным. Считается, что гуморальный иммунный ответ значимой роли в противотуберкулезном иммунитете не играет. Вместе с тем, в исследовании (1) показано образование фолликулоподобных В-клеточных образований в туберкулезной грануле, указывающих на существенную роль В-лимфоцитов в адекватной работе адаптивного иммунитета. Повышенный уровень антител на фоне снижения клеточного ответа способствует активации ЦТК, макрофагов.

Повышение числа NK- и NKT-клеток при увеличении тяжести заболевания (у 43,75% и 28% больных) связано с компенсаторной активацией неспецифического компонента защитных реакций, обусловленного снижением цитотоксической активности Т-киллеров при обширном некрозе легочной ткани, сопровождающимся нарушением антигенпрезентирующих, бактерицидных функций макрофагов и экспрессии MHC I [15]. Однако функциональная неполноценность этих клеток не компенсируется увеличением их числа. Если при ограниченных процессах NKT-клетки коррелируют с маркером активации HLA-DR $^{+}$  ( $r = 0,55; p < 0,05$ ), то при выраженном распаде легочной ткани эта связь исчезает.

Изменения, отмеченные в фагоцитарном звене, указывают на нарушение переваривающей способности нейтрофилов и ослабление возможности уничтожения возбудителя у лиц с выраженным распадом легочной ткани.

Фактический материал, полученный при оценке продукции цитокинов, подтвердил значительные отличия синтетической функции клеток у больных с ограниченной и распространенной деструкцией.

Выявленное у больных ФКТ снижение IFN $\gamma$ , наиболее резко выраженное при поражении обоих легких, согласуется с данными о падении его продукции при хроническом неблагоприятном течении заболевания и объясняется или функциональным истощением антигенспецифических Т-клеток, или подавлением функциональной активности Т-лимфоцитов микобактериями, противовоспалительными цитокинами, регуляторными Т-клетками [9, 10, 19].

Повышение продукции IL-2 в ответ на специфический индуктор у больных 1 группы отражает имеющуюся у них высокую преактивацию клеток *in vivo* при иммунном ответе на повторное массивное поступление туберкулезных антигенов. Снижение или отсутствие ответа на неспецифический митоген отражает рефрактерность клеток.

Характерное для больных ФКТ с обширным распадом легочной ткани отсутствие индуцированной РНА продукции IL-2, выработки IFN $\gamma$  отражает крайне низкое функциональное состояние иммунокомпетентных клеток [6, 10, 11].

Повышение индуцированной и спонтанной продукции IL-8 отражает имеющуюся у больных ФКТ с обширной деструкцией легочной ткани активацию нейтрофилов в ответ на поступление в организм бактериального антигена. Однако степень активации клеток выражена чрезмерно, что также может привести к массивным повреждениям ткани легкого [9].

Подводя итог выполненным исследованиям, можно заключить следующее. Возникновение и характер течения туберкулезной инфекции во многом зависят от эффективности функционирования иммунной системы. Вся группа обследованных больных неуклонно прогрессирующим ФКТ легких имеет в той или иной степени выраженные иммунологические нарушения. Наиболее значительные изменения в иммунной системе характерны для ряда больных с наличием множественных полостей распада легочной ткани. Выявленные нарушения в иммунном и цитокиновом статусе у ряда больных прогрессирующим ФКТ с обширной деструкцией указывают на несостоятельность иммунной системы с высокой возможностью развития иммунопатологии, что является предпосылкой к использованию иммуномодулирующих препаратов. Использование выделенных критериев поможет оценить степень тяжести иммунопатологических проявлений у больных ФКТ и целесообразность специальной подготовки к оперативному вмешательству.

## Список литературы

1. Авербах М.М. Туберкулезная гранулема: Современный взгляд на иммуногенез и клеточный состав // Туберкулез и болезни легких. — 2010. — № 6. — С. 3-9
2. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 3. — С. 20-35
3. Кетлинский С.А. Генетический анализ чувствительности организма к туберкулезной инфекции // Вестник акад. мед. наук. — 2001. — № 1. — С. 11-24.
4. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. — СПб., 1998. — 143 с.
5. Кисина Т.Е. Оценка индивидуальных особенностей мононуклеаров крови больных туберкулезом: Дис. канд. биол. наук — СПб., 2006.
6. Кноринг Б.Е., Фрейдлин И.С., Симбирцев А.С., Сахарова И.Я., Логинова Г.П., Елькин А.В., Басек Т.С., Иванова Л.А., Арчакова Л.И., Котов А.Ю., Пигарева Н.И., Ряснян-

ская Т.Б. Характер специфического иммунного ответа и продукция цитокинов мононуклеарами крови больных разными формами туберкулеза легких // Мед. иммунология. — 2001. — Т. 3, № 1. — С. 61-69.

7. Пичугин А.В., Апт А.С. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2005. — № 12. — С. 4-8.

8. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Курганова Е.В., Шевела Е.Я., Никонов С.Д., Жданов О.А., Мостовая Г.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2004. — № 11. — С. 23-28.

9. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, № 2. — С. 16-21.

10. Туберкулез: Патогенез, защита, контроль / Под ред. Барри Р. Блума. — М.: Медицина, 2002. — 696 с.

11. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. — СПб.: Наука, 2001. — 390 с.

12. Фролов В.М., Бойченко П.К., Пересадин Н.А. Диагностическое и прогностическое значение уровня циркулирующих иммунных комплексов у больных // Врачеб. дело. — 1990. — № 6. — С. 116-118.

13. Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И., Колосова А.Е., Воронкова О.В., Филинчук О.В., Некрасов Е.В., Есимова И.Е., Хасанова Р.Р. Особенности иммунорегуляции у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких // Мед. иммунология. — 2011. — Т. 13, № 2-3. — С. 267-272.

14. Boom W.H., Canaday D.H., Fulton S.A., Gehring A.J., Rojas R.E., Torres M. Human immunity to M. tuberculosis: T-cell subsets and antigen processing // Tuberculosis (Edinb). — 2003. — Vol. 83, N 1-3. — P. 98-106

15. Chan W.L., Pejnovic N., Liew T.V., Lee C.A., Groves R., Hamilton H. NKT cell subsets in infection and inflammation // Immun. Lett. — 2003. — Vol. 8, N 2. — P. 159-163.

16. Flynn J.L., Chan J. Immunology of tuberculosis // Ann. Rev. Immunol. — 2001. — Vol. 19. — P. 93-129.

17. Kaufmann S.H.E., Hahn H. Mycobacteria and TB. — Berlin, 2003. — 155 p.

18. Lazarevic V., Flynn J. CD8+ T Cells in tuberculosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2002. — Vol. 166. — P. 1116-1121.

19. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance // Cell. — 2008. — Vol. 133. — P. 775-787.

поступила в редакцию 17.10.2011

отправлена на доработку 03.01.2012

принята к печати 27.02.2012